

UTILISATION DE CATIONS METALLIQUES POUR L'AMELIORATION DE L'ACTIVITE FONCTIONNELLE DES ANTICORPS

5 La présente invention concerne l'utilisation de cations métalliques, notamment divalents ou trivalents, et plus particulièrement de Zinc, de Cuivre, de Cadmium ou de Fer, pour améliorer l'activité fonctionnelle d'anticorps. Plus particulièrement, l'invention a pour objet des compositions pharmaceutiques d'anticorps comprenant des cations métalliques divalents ou trivalents.

10

Introduction et art antérieur

L'immunothérapie passive, très répandue, est fondée sur l'administration d'anticorps, par exemple des anticorps monoclonaux dirigés contre une cellule ou une substance
15 donnée. L'immunothérapie passive au moyen d'anticorps monoclonaux a donné des résultats encourageants. Toutefois, si l'utilisation d'anticorps monoclonaux possède plusieurs avantages, comme par exemple une assurance de sécurité du produit quant à l'absence de contamination infectieuse, il peut en revanche s'avérer difficile d'obtenir un anticorps monoclonal efficace.

20

En effet, le risque est de développer un anticorps monoclonal qui s'avère peu efficace et pour lequel on observe des effets secondaires incompatibles avec une utilisation en
thérapie clinique. Ces deux aspects sont étroitement liés sachant que des anticorps peu
actifs sont administrés à fortes doses pour compenser leur faible activité et obtenir une
25 réponse thérapeutique. L'administration de fortes doses non seulement induit des effets secondaires mais est économiquement peu rentable.

Ces problèmes sont majeurs dans le développement industriel des anticorps monoclonaux, chimériques, humanisés ou humains. A titre d'exemple, la société

Protein Design Labs a suspendu les essais cliniques en phase I/II du Remitogen®, qui est un anticorps anti-HLA-DR pouvant être utilisé pour traiter les cancers de cellules MHC de classe II positives, notamment les leucémies des lymphocytes B et T.

- 5 Ainsi, un des objets de l'invention est de fournir de nouveaux produits ou procédés permettant de pallier les inconvénients rencontrés lors du développement industriel d'anticorps, à savoir leur faible efficacité et leur coût élevé.

Aujourd'hui, la recherche est orientée sur la région Fc de l'immunoglobuline (Ig) afin
10 d'améliorer les propriétés fonctionnelles des anticorps. A terme, cela devrait permettre l'obtention d'anticorps qui se lient et activent les récepteurs des cellules effectrices (monocytes /macrophages, lymphocytes B, cellules NK et dendritiques) de manière plus efficace. La région Fc des IgG est constituée de 2 domaines globulaires nommés CH2 et CH3. Les 2 chaînes lourdes interagissent étroitement au niveau des domaines
15 CH3 tandis qu'au niveau des domaines CH2, la présence, sur chacune des 2 chaînes, d'un oligosaccharide lié à l'Asn 297 (numérotation de Kabat) contribue à l'écartement des 2 domaines CH2. Par ailleurs, les domaines CH2 et CH3 d'une même chaîne sont séparés par une région flexible définissant une interface entre les 2 domaines.

20 L'interface entre les domaines CH2-CH3 a été décrite comme étant un site commun de fixation de nombreuses (glyco)protéines comme le FcRn, les facteurs rhumatoïdes (Corper et al., 1997) et certaines protéines bactériennes et virales, par exemple la protéine A de *Staphylococcus aureus* (Deisenhofer, 1981), la protéine G de *Streptococcus* de groupe G (Sauer-Eriksson et al., 1995), le complexe gE-gI du virus
25 Herpes simplex 1 (Chapman et al., 1999)) et la protéine « core » du virus de l'hépatite C (Maillard et al., 2004).

Par ailleurs, il a été démontré que certains résidus d'acides aminés, localisés au niveau de cette interface dans le domaine CH2 ou le domaine CH3, étaient impliqués dans la fixation au FcRn, à la protéine A, etc. Ainsi, les IgG1 humaines mutées au niveau du

résidu d'histidine 435 (His 435, numérotation de Kabat) perdent leur capacité à fixer le FcRn et la protéine A mais conservent leur capacité à fixer le FcγRIII (Firan et *al.*, 2001 ; Shields et *al.*, 2001).

- 5 Par contre, aucune des études notifiant des modifications de l'interface CH2-CH3 d'IgG humaines ou murines, ne montre une relation quelconque entre la structure de cette partie de la molécule d'IgG et les capacités effectrices de ces IgG via les récepteurs FcγR (FcγRI, FcγRII, FcγRIII).
- 10 Dans le cadre de l'invention, nous avons déterminé la structure tridimensionnelle des régions Fc de différents anticorps monoclonaux présentant des activités fonctionnelles différentes; notamment l'activité ADCC et l'induction de la production de cytokines. Nous avons découvert la présence d'un ion zinc situé entre les domaines CH2 et CH3, plus précisément, lié à des résidus localisés à l'interface des domaines CH2-CH3
- 15 impliquée dans la reconnaissance de la région Fc de l'anticorps par le récepteur FcRn ainsi que dans la fixation de la protéine A, issue de la paroi bactérienne de *Staphylococcus aureus*.

- De part sa localisation à l'interface des domaines CH2 et CH3, cet atome de zinc joue
- 20 un rôle important dans la conformation générale du Fc, et par là même permet l'amélioration de la liaison du Fc à ses récepteurs FcγRs.

- Nos études de la structure tridimensionnelle de la région Fc de ces anticorps ont révélé que la présence de cations métalliques tels que le Zinc, le Cuivre, le Cadmium ou le
- 25 Fer, dans la solution de cristallisation était toujours associée à la conformation dite ouverte de la région Fc des IgG (Radaev et *al.*, 2001). Cette conformation ouverte favorise la fixation aux récepteurs FcγR, notamment au FcγRIII. Ainsi, il est désormais possible de potentialiser l'activité fonctionnelle des anticorps monoclonaux ou polyclonaux au moyen de cations métalliques. A l'opposé, l'abolition de la fixation de

cations métalliques tels que le zinc, le cuivre, le cadmium ou le fer aux anticorps, plus particulièrement à l'interface CH2-CH3, par utilisation de mutants de la séquence peptidique ou de substances chimiques appropriées, conduit à l'obtention d'anticorps aux propriétés fonctionnelles abrogées ou fortement diminuées.

5

Ainsi, l'invention apporte une solution économique et universelle pour résoudre les problèmes liés à la faible efficacité des anticorps monoclonaux disponibles ou en cours de développement par l'utilisation de cations métalliques qui améliorent l'activité fonctionnelle d'anticorps. A cet effet, nous proposons une méthode pour potentialiser l'activité fonctionnelle des anticorps au moyen de cations métalliques. Enfin, par la modification du site de liaison aux cations métalliques, l'invention fournit également des anticorps de classe IgG1 possédant une capacité d'activation du récepteur FcγRIII diminuée, ainsi que des anticorps de classe IgG3 possédant artificiellement un site de fixation pour un cation métallique.

15

Description

Ainsi, un premier objet de l'invention est l'utilisation de cations métalliques divalents ou trivalents pour améliorer l'activité fonctionnelle d'anticorps.

20

Nos études tridimensionnelles de la région Fc des anticorps ont révélé que la présence de cations métalliques tels que le Zinc, le Fer, le Cuivre ou le Cadmium, était toujours associée à la conformation dite ouverte de la région Fc des IgG. Cette conformation ouverte favorise la fixation des anticorps aux récepteurs FcγR, notamment au FcγRIII.

25

Ainsi, il est désormais possible de potentialiser l'activité fonctionnelle des anticorps monoclonaux ou polyclonaux au moyen de tels cations métalliques.

De manière préférentielle, le cation métallique utilisé est le zinc. En effet, nos analyses ont permis de mettre en évidence la présence d'un ion zinc lié aux résidus d'histidine

310 et d'histidine 435 (dans la présente demande, la numérotation est celle de Kabat, Kabat database, <http://immuno.bme.nwu.edu>).

De part sa localisation sur la région Fc, cet atome de zinc joue un rôle important dans la conformation générale de la région Fc, et par là même permet l'amélioration de la
5 liaison de la région Fc à ses récepteurs.

Ainsi, de manière avantageuse, on utilise ces cations pour interagir avec la région Fc des anticorps afin de participer à la stabilisation de cette région.

Plus particulièrement, on les utilise afin de participer au contrôle de l'ouverture de la région Fc des anticorps et ainsi de favoriser le maintien de la conformation dite
10 « ouverte » des anticorps, c'est-à-dire le maintien d'un certain écartement entre les domaines CH2 favorisant la fixation de la région Fc sur ses récepteurs. La présence des cations métalliques permet d'induire une ouverture de la région Fc, même si le cation métallique ne se maintient pas dans son site.

Ainsi, de manière avantageuse, ces cations métalliques favorisent la fixation des
15 anticorps aux récepteurs Fc γ R, notamment au récepteur Fc γ RIII.

De plus, le cation métallique peut, dans un autre aspect de l'invention, favoriser le rapprochement de plusieurs régions Fc d'anticorps, via un deuxième site de fixation impliquant les résidus d'histidine 268 et 285 (numérotation de Kabat), facilitant
20 l'activation des Fc γ Rs, plus particulièrement des Fc γ RIII et la transduction de la signalisation par l'intermédiaire de ces récepteurs.

Par « activité fonctionnelle » on entend, de manière non limitative, l'activité ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity), l'activité CDC (Complement
25 Dependent Cytotoxicity), l'activité de phagocytose, l'activité d'endocytose ou encore l'induction de la sécrétion de cytokines. Ainsi, l'utilisation de cations métalliques tels que décrit dans l'invention permet d'améliorer l'activité fonctionnelle d'au moins 50%, préférentiellement 60%, ou 70%, 80%, 100%, et préférentiellement 200% ou 300%.

De plus, on entend par « récepteurs » non seulement les molécules de Fc γ R, telles que Fc γ RIII, présentes sur les cellules du système immunitaire telles les monocytes, les macrophages, les lymphocytes B et T, les cellules NK et les cellules dendritiques mais également le FcRn, les molécules du complément comme le C1q et celles des parois bactériennes comme la protéine A.

Par « anticorps », on entend tout anticorps polyclonal ou monoclonal. Si l'anticorps est un anticorps monoclonal, il peut être chimérique, humanisé ou humain. Avantagusement, cet anticorps est une IgG, par exemple une IgG1 ou une IgG3, notamment humaine. De plus, le terme anticorps inclut également toute glycoprotéine comportant une région Fc, par exemple humaine, et un ou plusieurs fragments, domaines ou dérivés d'anticorps. On entend par « domaine d'anticorps » l'un quelconque des domaines VL, CL, VH, CH1, CH2, CH3, CH4 ; par « fragment d'anticorps » tout fragment qui contient un site de fixation complet pour un antigène, choisi parmi les fragments Fv, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, et par « dérivé d'anticorps » tout anticorps pouvant comprendre une ou plusieurs mutations, substitutions, délétions et/ou additions d'un ou plusieurs résidus d'acides aminés, ainsi que les anticorps multi-spécifiques et polyfonctionnels.

Par « cation métallique divalent ou trivalent » ou par « cation métallique » on entend tout cation métallique ayant un degré d'oxydation +2 ou +3 et plus particulièrement le zinc, le fer, le cuivre, le cadmium, le cobalt, le nickel, le manganèse, le gallium, le gadolinium, le sélénium, l'or, le platine ou le palladium ou un analogue. Préférentiellement, ces cations métalliques sont le zinc, le fer, le cuivre ou le cadmium, et de manière particulièrement avantageuse il s'agit du zinc. Par « analogue » on entend tout ion libre ou lié susceptible de se lier au niveau de la région Fc des anticorps, et plus particulièrement aux résidus His 310, His 435, les résidus Asn 434 et His 433 (numérotation de Kabat) pouvant également participer à la fixation.

Un deuxième objet de l'invention concerne une méthode pour potentialiser l'activité fonctionnelle des anticorps via la région Fc, comprenant une étape consistant à ajouter une quantité appropriée d'au moins un cation métallique dans le système biologique produisant les anticorps ou dans une solution comprenant des anticorps avant et/ou
5 après purification ou encore dans la solution de conservation ou dans la formulation finale sous la forme d'une solution injectable des anticorps.

De manière avantageuse, ces cations métalliques sont le zinc, le fer, le cuivre ou le cadmium.

10 On entend par « système biologique » des lignées cellulaires, des plantes ou animaux transgéniques non humains. Parmi les cellules, on peut choisir des cellules provenant de lignées cellulaires, transfectées à l'aide d'un vecteur comportant le gène codant pour ledit anticorps, par exemple des cellules eucaryotes ou procaryotes, notamment des cellules de mammifères, d'insectes, de plantes, de bactéries ou de levures. Plus
15 spécifiquement, on peut utiliser des cellules de myélome de rat telle que YB2/0.

On peut également utiliser des cellules CHO, notamment CHO-K, CHO-Lec10, CHO-Lec1, CHO Pro-5, CHO dhfr- ou d'autres lignées cellulaires parmi Wil-2, Jurkat, Vero, Molt-4, COS-7, 293-HEK, K6H6, NSO, SP2/0-Ag 14 et P3X63Ag8.653, PERC6 ou BHK.

20

De manière préférentielle, on ajoute une concentration molaire en zinc au moins égale à la concentration molaire en anticorps.

Eventuellement, on ajoute une concentration molaire en zinc au moins égale à 2 fois, et préférentiellement à 3 fois ou à 4 fois la concentration molaire en anticorps.

25 Alternativement, on ajoute une concentration molaire en cations métalliques permettant d'améliorer l'activité fonctionnelle de l'anticorps d'au moins 25%, préférentiellement 50% ou 60%, 70%, 80%, 100%, et préférentiellement 200 ou 300%.

Avantageusement, les cations métalliques existent sous différentes formes. Dans un aspect particulier de l'invention, les ions zinc peuvent être sous forme d'acétate de zinc, de bromure de zinc, de chlorhydrate de zinc, de chlorure de zinc, de citrate de zinc, de gluconate de zinc, d'hydroxycarbonate de zinc, d'iodure de zinc, de L-lactate de zinc, de nitrate de zinc, de stéarate de zinc, ou de sulfate de zinc.

Un autre objet de l'invention se rapporte à des anticorps de classe IgG3, et plus particulièrement les allotypes G3m(b) et G3m(g), possédant un site de fixation pour un cation métallique comprenant les résidus His 310 et His 435 sur sa région Fc créé par ingénierie moléculaire.

Dans le cadre de l'invention, nous avons mis en évidence que des cations métalliques se fixent sur les anticorps de classe IgG1 sur un site comprenant les résidus His 310 et His 435, les résidus His 433 et Asn 434 pouvant eux aussi être impliqués dans cette fixation. Or, les anticorps de classe IgG3 d'allotype G3m(b) ou G3m(g) ne comportent pas un tel site de fixation à l'état naturel. En effet, ils possèdent un résidu arginine (Arg) en position 435. Ainsi, dans le cadre de l'invention, nous créons, par mutagenèse dirigée, des anticorps de classe IgG3 présentant une fixation de cations métalliques améliorée par rapport aux anticorps non modifiés, de par la création d'un site de fixation impliquant un résidu His 435 en substitution du résidu Arg 435.

Ainsi, ces anticorps IgG3 comportent un site de fixation pour un cation métallique, notamment le zinc, le fer, le cuivre, le cadmium, le cobalt, le nickel, le manganèse, le gallium, le sélénium, l'or, le platine ou le palladium, comprenant les résidus His 310 et His 435, et de manière avantageuse comprenant aussi le résidu Asn 434 et/ou His 433. De manière avantageuse, l'un au moins de ces résidus histidine est remplacé par un au moins des résidus choisis parmi la cystéine, l'acide aspartique et l'acide glutamique. En effet, ces résidus possèdent aussi la capacité de fixer de tels cations métalliques. Préférentiellement, le cation métallique est le zinc, le fer, le cuivre ou le cadmium, et de manière préférée le zinc.

Dans un aspect particulier de l'invention, l'anticorps possède un cation métallique, et plus particulièrement un atome de zinc, lié à un ou plusieurs résidus de la région Fc. De manière particulièrement avantageuse, cet anticorps IgG3 possède une capacité de fixation au FcγRIII et une activité fonctionnelle améliorées par rapport à l'anticorps natif.

Un objet de l'invention est ainsi l'utilisation de l'anticorps IgG3 possédant un site de fixation pour un cation métallique précédemment décrit pour la préparation d'un médicament destiné au traitement d'une pathologie comme la maladie hémolytique du nouveau-né, une pathologie virale, bactérienne ou parasitaire, une pathologie liée aux agents pathogènes ou toxines dérivées, listés comme étant particulièrement dangereux dans les cas de bioterrorisme (classification des Centers for Disease Control, CDC), notamment l'anthrax (*Bacillus anthracis*), le botulisme (*Clostridium botulium*), la peste (*Yersinia pestis*), la variole (*Variola major*), la tularémie (*Francisella tularensis*), les fièvres hémorragiques virales (liées aux filovirus –Ebola, Marburg et aux arenavirus –Lassa, Machupo), la toxine *epsilon* de *Clostridium perfringens*, la brucellose (*Brucella species*), la melioidose (*Burkholderia mallei*), la toxine de ricin (*Ricinus communis*).

Un autre objet de l'invention est une composition pharmaceutique d'anticorps thérapeutiques comprenant des cations divalents ou trivalents et au moins un excipient. De manière préférée, ces cations métalliques sont le zinc, le fer, le cuivre ou le cadmium, ou un mélange de plusieurs d'entre eux. De manière particulièrement avantageuse, on choisit le zinc, qui peut être sous forme d'acétate de zinc, de bromure de zinc, de chlorhydrate de zinc, de chlorure de zinc, de citrate de zinc, de gluconate de zinc, d'hydroxycarbonate de zinc, d'iodure de zinc, de L-lactate de zinc, de nitrate de zinc, de stéarate de zinc, ou de sulfate de zinc.

Dans un aspect particulier, les anticorps contenus dans la composition possèdent un cation métallique selon l'invention lié aux résidus His 310 et His 435, les résidus His 433 et Asn 434 pouvant également participer à la fixation.

- 5 Dans un autre aspect particulier de l'invention, les anticorps de la composition pharmaceutique sont les anticorps de classe IgG3 créés par ingénierie moléculaire décrits précédemment. Dans un autre aspect préféré de l'invention, ce sont des IgG humaines ou ayant une région Fc humaine.
- Ainsi, la présence de tels cations métalliques dans la composition améliore la fixation
- 10 des anticorps thérapeutiques qu'elle contient à ses récepteurs, notamment les FcγRIII, la composition possédant ainsi une meilleure activité thérapeutique.

- Un autre objet de l'invention est une composition pharmaceutique dans laquelle au moins 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou encore 99% des anticorps possèdent un cation
- 15 métallique divalent ou trivalent, notamment un ion zinc, lié à un site se trouvant dans la région Fc. Il peut s'agir de manière préférentielle du site de fixation comprenant les acides aminés His 310 et His 435, l'acide aminé Asn 434 et/ou His 433 étant susceptible(s) de participer à la fixation. Dans un autre aspect de l'invention, il peut s'agir du site de fixation comprenant les acides aminés His 268 et His 285. Dans un
- 20 autre aspect de l'invention, les 2 sites peuvent être occupés par un cation métallique tel que décrit dans l'invention.

- Le cation métallique est de manière préférentielle un de ceux déjà cités précédemment, notamment le zinc, le fer, le cuivre ou le cadmium, ou un mélange de plusieurs d'entre
- 25 eux, éventuellement sous les formes déjà évoquées.

Un autre objet de l'invention est une solution comprenant un anticorps monoclonal ou des anticorps monoclonaux et une quantité appropriée de cations métalliques divalents ou trivalents, en particulier d'ions zinc au moins égale à la concentration molaire en

anticorps, cette solution étant adaptée pour une injection par voie intraveineuse, sous-cutanée ou intramusculaire.

Les cations métalliques peuvent être tout cation métallique divalent ou trivalent, notamment du zinc, du fer, du cuivre, du cadmium, du cobalt, du nickel, du manganèse, du gallium, du sélénium, du or, du platine ou du palladium ou un analogue. De manière préférée, le cation est un ion zinc ou d'acétate de zinc, de bromure de zinc, de chlorhydrate de zinc, de chlorure de zinc, de citrate de zinc, de gluconate de zinc, d'hydroxycarbonate de zinc, d'iodure de zinc, de L-lactate de zinc, de nitrate de zinc, de stéarate de zinc, ou de sulfate de zinc.

Un autre objet de l'invention est l'utilisation d'ions zinc pour améliorer la cristallisation d'anticorps thérapeutiques, et plus particulièrement d'IgG monoclonaux, les ions zinc stabilisant la région Fc des anticorps. L'ajout de cations divalents et plus particulièrement de zinc, augmente significativement la solubilité des Fc des IgGs, en favorisant les contacts cristallins ce qui facilite l'obtention des cristaux nécessaires aux études structurales.

L'invention a également pour objet de fournir un test permettant d'évaluer l'efficacité d'un anticorps comprenant l'étude de la conformation 3D, notamment du domaine impliquant les résidus His 310, His 435, His 433 et/ou Asn 434 de la région Fc telle que montrée à la figure 1 ou 2 ou encore un dosage de la teneur en zinc desdits anticorps, la présence de zinc étant une indication de l'efficacité de l'anticorps.

Un autre objet de l'invention se rapporte à un anticorps possédant l'un au moins de ses résidus His 310 et His 435 modifié.

Dans un aspect particulier de l'invention, la modification de l'anticorps est une mutation, notamment une substitution par un acide aminé possédant une faible affinité

pour les cations métalliques divalents ou trivalents. Par exemple, le résidu His 310 et/ou le résidu His 435 peu(ven)t être substitué(s) par un résidu de lysine, d'alanine, de glycine, de valine, de leucine, d'isoleucine, de proline, de méthionine, de tryptophane, de phénylalanine, de sérine ou de thréonine.

- 5 De manière particulièrement avantageuse, les résidus His 310 et His 435 sont substitués tous les deux par des résidus de lysine.

Ces mutants peuvent être réalisés à partir de tout anticorps possédant à l'état « naturel », c'est-à-dire non muté, un site de fixation pour les cations métalliques comprenant les résidus His 310 et His 435. Il peut s'agir notamment d'IgG1, d'IgG3

- 10 allotypes G3m(s) ou G3m(st), IgG2 ou IgG4.

Ces mutants possèdent une capacité d'activation du Fc γ RIII diminuée de façon significative.

- 15 Dans un deuxième mode de réalisation, la modification peut être réalisée par le DEPC (diéthyl pyrocarbonate), un agent modifiant les histidines.

Avantageusement, ces anticorps sont des IgG1, ou en tout état de cause des anticorps possédant à l'état « naturel », c'est-à-dire non muté, un site de fixation pour les cations métalliques comprenant les résidus His 310 et His 435.

- 20 Ces anticorps possèdent une activité fonctionnelle diminuée par rapport au même anticorps non modifié. Toutefois, ils conservent leur capacité à fixer l'antigène et le Fc γ RIII.

- 25 Ainsi, l'invention fournit des anticorps possédant une faible activité ADCC, présentant un intérêt particulier en thérapie en remplacement des IgG4, ou pour prévenir les rejets de greffe. On peut encore utiliser les anticorps double mutants selon l'invention comme anti-tétaniques, anti-diphthériques ou dirigés contre des agents pathogènes ou toxines dérivées, listés comme étant particulièrement dangereux dans les cas de bioterrorisme (classification des Centers for Disease Control, CDC), notamment l'anthrax (*Bacillus anthracis*), le botulisme (*Clostridium botulium*), la peste (*Yersinia*

pestis), la variole (*Variola major*), la tularémie (*Francisella tularensis*), les fièvres hémorragiques virales (liées aux filovirus –Ebola, Marburg et aux arenavirus –Lassa, Machupo), la toxine *epsilon* de *Clostridium perfringens*, la brucellose (*Brucella species*), la melioidose (*Burkholderia mallei*), la toxine de ricin (*Ricinus communis*).

5

Ainsi, un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'anticorps modifiés comme décrit ci-dessus, et possédant donc une activité fonctionnelle faible, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention du rejet de greffe ou au traitement d'une pathologie choisie parmi le tétanos, la diphtérie, ou provoquée par un agent pathogène ou toxine dérivée, listé comme étant particulièrement dangereux dans les cas de bioterrorisme (classification des Centers for Disease Control, CDC), notamment l'anthrax (*Bacillus anthracis*), le botulisme (*Clostridium botulium*), la peste (*Yersinia pestis*), la variole (*Variola major*), la tularémie (*Francisella tularensis*), les fièvres hémorragiques virales (liées aux filovirus –Ebola, Marburg et aux arenavirus –Lassa, Machupo), la toxine *epsilon* de *Clostridium perfringens*, la brucellose (*Brucella species*), la melioidose (*Burkholderia mallei*), la toxine de ricin (*Ricinus communis*).

15

20

Enfin, des anticorps possédant une activité fonctionnelle altérée comme précédemment décrits sont aussi utilisés pour la préparation d'un médicament en remplacement des IgG4.

25

A titre d'exemple, les anticorps décrits dans l'invention, notamment les anticorps possédant une activité fonctionnelle améliorée due aux cations métalliques, ou les anticorps modifiés dont l'activité fonctionnelle est altérée, ou encore les compositions ou solutions de l'invention, peuvent être choisis parmi les anti Ep-CAM, anti-KIR3DL2, anti-EGFR, anti-VEGFR, anti HER1, anti HER2, anti GD, anti GD2, anti GD3, anti-CD20, anti CD-23, anti CD-25, anti-CD30, anti-CD33, anti-CD38, anti-CD44, anti CD52, anti CA125 et anti ProteinC, anti-HLA-DR, les anti-viraux: HBV, HCV, HIV et RSV, et plus particulièrement parmi les anticorps du Tableau I ci-après :

Tableau I :

Nom et marque commerciale de l'anticorps	Société	cible	indication
Edrecolomab PANOREX	Centocor	anti Ep-CAM	cancer colorectal
Rituximab RITUXAN	Idec Licencié à Genentech/ Hoffman la roche	anti CD20	B cell lymphoma thrombocytopenia purpura
Trastuzumab HERCEPTIN	Genentech Licencié à Hoffman la roche/Immunogen	anti HER2	cancer ovarien
Palivizumab SYNAGIS	Medimmune Licencié à Abott		RSV
Alemtuzumab CAMPATH	BTG Licencié à Schering	anti CD52	leukemia
ibritumomab tiuxetan ZEVALIN	IDEC Licencié à Schering	anti CD20	NHL
Cetuximab IMC-C225	Merck /BMS / Imclone	anti EGFR	cancers
Bevacizumab AVASTIN	Genentech/ Hoffman la roche	anti VEGFR	cancers

Epratuzumab	Immumedics/ Amgen	anti CD22	cancers: lymphome non hogkinien
Hu M195Mab	Protein Design Labs	Anti CD33	cancers
MDX-210	Immuno-Designed Molécules	ND	cancers
BEC2	Imclone	anti GD3	cancers
Mitumomab			
Oregovomab OVAREX	Altarex	anti CA125	cancer ovarien
Ecromeximab	Kyowa-Hakko	anti GD3	melanome malin
KW-2971			
ABX-EGF	Abgenix	EGF	cancers
MDX010	Medarex	Anti CD4R	Cancers
XTL 002	XTL biopharmaceuticals	ND	anti-viral : HCV
H11 SCFV	viventia biotech	ND	cancers
4B5	viventia biotech	anti GD2	Cancers
XTL 001	XTL biopharmaceuticals	ND	anti-viral : HBV
MDX-070	MEDAREX	Anti-PSMA	cancer de la Prostate
TNX-901	TANOX	anti IgE	Allergies
IDEC-114	IDEC	inhibition ProteinC	lymphome non-Hodgkinien

Par exemple, l'invention porte sur une solution se trouvant sous la forme d'un concentré à une concentration d'anticorps allant de 0,1 à 50 mg/mL, ou 1 à 25 mg/mL qui peut être formulé pour une administration IV. Le soluté peut contenir à titre d'exemple : 9,0 mg/mL chlorure de sodium, 7,35 mg/mL citrate de sodium dihydraté, et 0,7 mg/mL polysorbate-80 dans de l'eau stérile. Dans ce soluté ou concentré, on rajoute en outre de 0,1 à 50 mg/mL, ou 1 à 20 mg/mL d'un cation, la concentration dudit cation étant égale à 1, 2, 3, 4 ou 5 fois la concentration en anticorps soit de 0,1 à 250 mg/mL ou de 1 à 100 mg/mL. Ce concentré peut être injecté dans une poche de sérum ou de liquide de perfusion de sorte à obtenir la dose que l'on souhaite administrer, tout en maintenant la même teneur en cation par rapport à la teneur en anticorps.

L'invention porte également sur une poudre lyophilisée, stérile dans un contenant et qui peut être reconstituée avec de l'eau stérile juste avant injection comprenant la quantité appropriée d'anticorps et la quantité dudit cation selon l'invention 1, 2, 3, 4 ou 5 fois supérieure à celle de l'anticorps.

On peut reconstituer cette poudre pour une injection IV ou sous-cutanée. Dans ce dernier cas, la poudre peut comprendre de 10 à 500 mg d'anticorps et une quantité dudit cation selon l'invention 1, 2, 3, 4 ou 5 fois supérieure à celle de l'anticorps, soit par exemple de 10 à 500 mg. On peut rajouter les excipients tels que le sucre, un acide aminé, du polysorbate.

Il faut comprendre que l'invention concerne préférentiellement les compositions décrites ci-dessus dans lesquelles la teneur en cation est au moins égale à la teneur en anticorps, mais vise également toute composition dans laquelle on rajoute une quantité de cation (zinc, fer, cuivre, cadmium, ou un analogue, ou leur mélange) inférieure à ladite quantité équimolaire, par exemple de 0,1 à 0,99 molaire (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 ou 0,9 molaire), mais toujours suffisante pour améliorer d'au moins 10%

ou 25%, ou 50% ou encore 100% l'efficacité et/ou les propriétés fonctionnelles de l'anticorps.

D'autres aspects et avantages de l'invention seront décrits dans les exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et ne limitent pas l'étendue de l'invention.

Afin d'acquérir des données nouvelles sur les relations structure-fonction de la région Fc des anticorps, le demandeur a cristallisé les fragments Fc de l'anticorps monoclonal EMAB5, exprimé dans la lignée cellulaire YB2/0, en présence ou en absence de zinc. Une étude par diffraction des rayons X (RX) des fragments Fc cristallisés a été entreprise ; une partie de cette étude est présentée dans les exemples 1 et 2 qui suivent. L'exemple 3 montre l'effet d'une modification chimique des histidines sur l'activité Fc et l'exemple 4 l'effet d'une double mutation des résidus histidine 310 et 435 en lysines.

Description des figures

Figure 1 : Schéma montrant la position des ions Zn^{2+} au voisinage du fragment Fc de l'anticorps monoclonal EMAB5 (2Å).

Figure 2 : Détail de la carte de densité électronique au voisinage des résidus d'histidine 310 et 435.

Figure 3 : Superposition des structures du fragment Fc de l'anticorps EMAB5 obtenues en absence (gris) et en présence (blanc) d'ion Zn^{2+} .

Figure 4 : Fixation de l'anticorps EMAB5 modifié par le DEPC au récepteur FcγRIII. Cette figure présente en abscisse la fixation des anticorps sur les hématies et en ordonnée la fixation du CD16 (FcγRIII) présent à la surface des cellules Jurkat CD16.

(◆) anticorps témoin AD1 ; (■) EMAB5 témoin ; (▲) EMAB5 FNR ; (●) EMAB5 FR.

Figure 5 : Activation par l'anticorps EMAB5 modifié par le DEPC du récepteur

5 FcγRIII présent sur les cellules Jurkat CD16.

Cette figure représente la quantité, exprimée en pg/ml, d'IL-2 sécrétée par les cellules Jurkat CD16 dont le récepteur CD16 a été activé par l'anticorps EMAB5 témoin (◆) et les fractions séparées sur protéine A après modification de l'anticorps EMAB5 par le DEPC : FNR (●), FR (■).

10

Figure 6 : Effet de la modification par le DEPC sur l'activité ADCC de l'anticorps monoclonal EMAB5.

15 Cette figure représente le pourcentage de lyse des hématies Rh(D+) induite par l'anticorps monoclonal EMAB5 témoin et par les 2 fractions FR et FNR, séparées sur gel de Sépharose-protéine A, de l'anticorps modifié par le DEPC.

Figure 7 : Mesure de la fixation du Fc des anticorps doublement mutés His310-435Lys au récepteur FcγRIII. Les anticorps 1C7, 2H11, 4G5 et 4H10 sont les anticorps mutés.

20 Les anticorps 16D11, 11G5 et 6H11 ne sont pas mutés. Cette figure présente en abscisse, la fixation des anticorps sur les hématies et en ordonnée la fixation du CD16 (FcγRIII) présent à la surface des cellules Jurkat CD16. La figure regroupe les résultats obtenus avec les surnageants contenant les anticorps doublement mutés (courbes en trait plein) et ceux contenant des anticorps non mutés (courbes en pointillés).

25

Figure 8 : Etude de la sécrétion d'IL-2 induite par des anticorps monoclonaux anti-Rh(D) mutés ou non. Cette figure représente le pourcentage d'IL-2 sécrété par des anticorps monoclonaux anti-Rh(D) natifs (n = 3 clones) et portant la double mutation

His310-435Lys (n = 4 clones). Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à un anticorps témoin purifié, EMAB5.

Figure 9 : Influence de l'imidazole sur la fixation de l'anticorps monoclonal EMAB5 au récepteur CD16 (FcγRIII).

Figure 10 : Etude par cytométrie en flux de la fixation des anticorps portant la double mutation His310-435Lys au récepteur CD16

10 EXEMPLES

Afin d'acquérir des données nouvelles sur les relations structure-fonction de la région Fc des anticorps, le demandeur a cristallisé les fragments Fc de l'anticorps monoclonal EMAB5, exprimé dans la lignée cellulaire YB2/0, en présence ou en absence de zinc.

15 Une étude par diffraction des rayons X des fragments Fc cristallisés a été entreprise ; une partie de cette étude est présentée dans les exemples 1 et 2 qui suivent. L'exemple 3 montre l'effet d'une modification chimique des histidines sur l'activité Fc et l'exemple 4 l'effet d'une double mutation des résidus histidine 310 et 435 en lysines.

20 **Anticorps monoclonal :**

EMAB5. Il s'agit d'une IgG1(κ) humaine, dirigée contre l'antigène Rh(D), produite dans la lignée cellulaire YB2/0 (myélome de rat, lignée ATCC n° CRL 1662) adaptée à la culture en milieu sans sérum.

25 - Purification : EMAB5 a été purifié par chromatographie d'affinité sur Sépharose-protéine A.

- Analyse glycanique : par HPCE-LIF, il a été montré que la structure majoritaire est un oligosaccharide de type biantenné, contenant environ 25 % de fucose.

- Activité biologique : l'activité ADCC de EMAB5 est au moins égale à celle de l'anticorps polyclonal anti-Rh(D) de référence, WinRho (Cangène).

Préparation du fragment Fc :

- Conditions d'hydrolyse : L'anticorps purifié EMAB5 est dialysé une nuit contre du tampon Tris 50 mM, pH 8,0. La solution d'anticorps, ajustée à 50 mM CaCl₂ et 10 mM cystéine, est incubée 30 min. à 37°C avant d'ajouter la solution de trypsine (1 mg/ml) dans un rapport enzyme/substrat de 1/25. Après 5 h. d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée par l'addition de diisopropyl fluorophosphate (1 mM final). L'hydrolysate est dialysé une nuit contre du tampon Imidazole 50 mM, pH 7,8.
- 10 - Purification du fragment Fc : L'hydrolysate dialysé est mis en contact avec de l'Affarose-protéine L à raison de 1 ml de gel pour 3,6 mg d'anticorps. Après 4 h. d'incubation à température ambiante sous agitation, le gel est monté en colonne et lavé par le tampon Imidazole 50 mM, pH 7,8. L'effluent et le tampon de lavage qui contiennent les fragments Fc sont réunis, concentrés par centrifugation sur Vivaspin 20
- 15 en utilisant les conditions décrites par le fabricant.

EXEMPLE 1. Présence d'ions zinc liés aux fragments Fc.

- Cristallogénèse :** Après mise au point, les conditions de cristallisation retenues sont les suivantes : la solution de fragments Fc, à 2 mg/ml en tampon imidazole 50 mM, pH 7,8, est amenée à 10% de monométhyl polyéthylène glycol 5 000, 100 mM cacodylate de sodium, 0.1 mM chlorure de zinc, pH 5,1 par diffusion de vapeur en gouttes assies à 17°C.
- 20

- Collection des données de diffraction et détermination de la structure :** Le cristal obtenu est soumis aux RX à l'ESRF de Grenoble et les informations collectées sont traitées par les programmes DENZO et SCALEPACK (Otwinowski and Minor, 1997).
- 25

La structure est résolue et affinée à 2.3 Å (Fig.1) en utilisant la suite des programmes CCP4.

Résultats : Ce cristal du fragment Fc de EMAB5 appartient au groupe spatial C222₁ avec un fragment par unité asymétrique. Les paramètres de maille sont les suivants : a = 50.2 Å; b = 147.7 Å; c = 75.6 Å ; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$.

La structure tridimensionnelle (schématisée à la figure 1) permet de mettre en évidence la présence d'ions zinc (en blanc) près des domaines CH2 et CH3 (en gris). La carte de densité électronique présentée figure 2 montre l'ion zinc lié aux résidus d'histidine 310 (CH2) et 435 (CH3). Un autre ion zinc est lié à l'histidine 268 d'un Fc et à l'histidine 285 d'un Fc symétrique. Le troisième se trouve près de l'histidine 433.

EXEMPLE 2. Effet des cations métalliques sur la conformation des fragments Fc.

Dans cet exemple, les cristaux obtenus appartiennent tous au groupe d'espace P2(1)2(1)2(1) avec deux chaînes par unité asymétrique et on caractérise l'ouverture des Fc par les distances entre les résidus de proline 329 des chaînes A et B et entre les résidus de mannose 4 des chaînes A et B.

Cristallisés en absence d'ion métallique, les fragments Fc de l'anticorps EMAB5 sont caractérisés par une distance entre prolines 329 de 32,53 Å et une distance entre mannoses 4 de 17,61 Å. Lorsque l'on ajoute un ion métallique à la solution de cristallisation (voir Tableau II), ces distances caractéristiques augmentent.

Tableau II : Principales caractéristiques des cristaux du fragment Fc de l'anticorps monoclonal EMAB5 dans le groupe d'espace P2(1)2(1)2(1).

Code	Métal dans Sol. Cristal.	Résolution (Å)	Paramètres de maille (Å; angles=90Å)	D Pro 329 (Å)	D Man 4 (Å)
Fc1_nat	Non	3,29	48,982 75,498 145,032	32,53	17,61
Fc1_Zn	0,3mM ZnCl ₂	3,2	49,716 75,516 150,298	37,12	20,34
Fc1-Gd	2mM GdCl ₃	2,7	49,816 76,068 151,156	37,4	20,75
Fc1_Cu	0,3mM Cu ⁺⁺ Ac	3,15	49,462 74,985 148,928	35,87	19,79
Fc1_Fe	0,1mM Fe ³⁺	3,475	49,056 74,937 148,148	35,78	19,61
Fc1_Cd	0,2mM CdCl ₂	2,894	49,253 75,079 147,953	36,18	19,2

- 5 La figure 3 montre la superposition des chaînes principales des structures obtenues en absence (en gris) et en présence de zinc (blanc) dans la solution de cristallisation. L'addition d'un sel métallique à la solution de Fc favorise donc une conformation dite ouverte, conformation proche de celle du Fc lié au récepteur FcγRIII.

10 **EXEMPLE 3 : Modification des résidus histidine par le DEPC**

Le diéthylpyrocarbonate (DEPC) est un réactif qui a été très utilisé pour modifier et étudier le rôle des résidus d'histidine présents dans les protéines (Miles, 1977). Firan et *al.*(2001) ont montré que des IgG1 humaines traitées par le DEPC perdaient leur

capacité à fixer le récepteur FcRn qui est impliqué dans le transfert des IgG maternelles vers le fœtus. Le DEPC agit par substitution d'un groupement nitrogène présent sur le cycle imidazole de l'histidine, transformant ainsi le résidu d'histidine en 3-carboéthoxy histidine.

5

1. Modification par le DEPC

L'anticorps monoclonal EMAB5, dialysé contre du tampon acétate de sodium 0,1M, pH 6,0, est mis en contact avec du DEPC à raison de 70 µg de DEPC/mg d'IgG. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la réaction est arrêtée par l'addition
10 d'imidazole (0,2 mg/ml final).

Après dessalage en tampon phosphate de sodium 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2, l'anticorps monoclonal modifié est fractionné par chromatographie d'affinité sur Sépharose-protéine A. Une fraction de l'anticorps monoclonal modifié n'est pas retenue sur le gel d'affinité et constitue la fraction non retenue ou FNR. La fraction
15 retenue sur le gel et appelée FR est éluée par du tampon Glycine-HCl 0,1M, pH 2,8. Les deux fractions ainsi obtenues sont dialysées contre du tampon Phosphate de sodium 20mM, NaCl 50 mM, pH 7,2, concentrées sur Vivaspin selon les recommandations du fabricant et conservées à 4°C pendant 15 jours maximum.

L'anticorps témoin, qui nous sert de référence, a subi le même traitement hormis le
20 DEPC qui a été remplacé par un volume identique d'éthanol.

2. Mesure de la fixation du Fc des anticorps au récepteur FcγRIII par test CFC.

Afin de vérifier l'intégrité des anticorps traités par le DEPC, les anticorps sont soumis
25 à un test, appelé CFC, qui estime la capacité des anticorps à fixer, dans un premier temps, l'antigène contre lequel ils sont dirigés puis, dans un second temps, le récepteur FcγRIII (CD16) exprimé à la surface de la lignée cellulaire Jurkat CD16.

Les puits d'une plaque de microtitration sont recouverts par des hématies Rh(D+) papainées. Les anticorps anti-Rh(D), dilués à des concentrations variant de 7,8 à 500

ng/ml en IMDM + 2,5% sérum de veau foetal (SVF) sont déposés en parallèle sur deux plaques de microtitration préalablement « coatées » par les hématies. Après 90 min. d'incubation à 37°C, les puits sont lavés.

5 L'une des plaques, utilisée pour détecter les IgG fixées sur les hématies, est incubée en présence d'un anticorps de souris anti-Fc γ humain marqué à la phosphatase alcaline (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

Dans l'autre plaque, les cellules Jurkat CD16, diluées à la concentration de 2×10^6 cellules/ml en IMDM + 1% SVF, sont ajoutées. Après 15 min. de contact à 37°C, la plaque est centrifugée en augmentant progressivement la vitesse et la durée de
10 centrifugation jusqu'à négativer les témoins négatifs. On entend par témoin négatif des anticorps qui se fixent aux hématies immobilisées dans les puits de la plaque de microtitration mais qui ne fixent pas le récepteur Fc γ RIII présent à la surface des cellules Jurkat CD16. Dans les puits contenant le témoin négatif, les cellules Jurkat CD16, après centrifugation, forment un amas au centre du puits alors que dans les puits
15 contenant un témoin positif, les cellules Jurkat CD16 tapissent le puits.

Après centrifugation, la lecture des puits est effectuée et un score est donné en fonction de l'étalement de cellules Jurkat CD16 dans le puits.

3. Mesure de l'activation du récepteur Fc γ RIII

20 Le test d'activation des cellules Jurkat CD16 mesure la sécrétion de l'interleukine-2 (IL-2) induite par la fixation du Fc des anticorps sur le récepteur Fc γ RIII (CD16) après liaison du Fab à son antigène, présent sur la cellule cible. Le taux d'IL-2 sécrétée par les cellules Jurkat CD16 est proportionnel à l'activation du récepteur CD16.

Dans une plaque de microtitration de 96 puits, on dépose successivement 50 μ l de
25 dilutions d'anticorps, 50 μ l d'une suspension d'hématies à 6.10^5 /ml, 50 μ l d'une suspension de cellules Jurkat CD16 à 1.10^6 /ml et 50 μ l d'une solution de PMA à 40 ng/ml. Toutes les dilutions ont été réalisées en milieu de culture IMDM contenant 5% de SVF.

Après 16 heures d'incubation à 37°C et 7% de CO₂, la plaque de microtitration est centrifugée et la quantité d'IL-2 contenue dans le surnageant est dosée par un kit commercial (Duoset, R&D). Les taux d'IL-2 secrétée sont exprimés en pg/ml.

Les résultats sont exprimés en % d'activation CD16, le taux d'IL-2 secrétée en présence de l'anticorps monoclonal témoin étant considéré égal à 100%.

4. Mesure de l'activité ADCC

La technique ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) permet d'évaluer la capacité des anticorps à induire la lyse des hématies Rh(D+), en présence de cellules effectrices (cellules mononucléées ou lymphocytes).

Brièvement, les hématies d'un concentré globulaire RhD(+) sont traitées à la papaïne (1mg/ml, 10 min à 37°C) puis lavées en NaCl 0,9%. Les cellules effectrices sont isolées à partir d'un pool d'au moins 3 buffy-coat, par centrifugation sur Ficoll (Amersham Biosciences), suivi d'une étape d'adhérence en présence de 25% de SVF, de façon à obtenir un ratio lymphocytes/monocytes de l'ordre de 9. Dans une plaque de microtitration (96 puits) on dépose par puits : 100 µl d'une dilution d'anticorps anti-Rh(D) purifié (de 9,3 à 150 ng/ml), 25 µl d'hématies papainées Rh(D+) à 4×10^7 , 25 µl de cellules effectrices à 8×10^7 et 50 µl d'IgG polyvalentes (Tégéline, LFB) aux concentrations usuelles de 2 et 10 mg/ml. Les dilutions sont faites en IMDM contenant 0,25% de SVF. Après incubation 1 nuit à 37°C, les plaques sont centrifugées, puis l'hémoglobine libérée dans le surnageant est mesurée par l'intermédiaire de son activité peroxydasique en présence d'un substrat chromogénique, le 2,7-diaminofluorène (DAF). Les résultats sont exprimés en pourcentage de lyse, 100% correspondant à la lyse totale des hématies en NH₄Cl (témoin 100%) et 0% au mélange réactionnel sans anticorps (témoin 0%). La lyse spécifique est calculée en pourcentage selon la formule suivante :

$$\frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO témoin 0\%}) \times 100}{\text{DO témoin 100\%} - \text{DO témoin 0\%}} = \% \text{ ADCC}$$

Résultats :

Après traitement par le DEPC suivant les conditions décrites ci-dessus, environ 20% des molécules de l'anticorps monoclonal EMAB5, constituant la fraction FNR, perdent leur capacité à se fixer au gel de Sépharose-protéine A. Sachant que l'histidine 435 est un acide aminé essentiel de la fixation des IgG à la protéine A, il paraît vraisemblable que les IgG de la fraction FNR se différencient de la fraction FR, retenue sur le gel de Sépharose-protéine A, par la modification du résidu His435.

Dans le test de mesure de la fixation au récepteur CD16 en présence d'antigène, la fraction FNR présente les mêmes capacités que la fraction FR, capacités qui sont identiques à celles de l'anticorps témoin (Fig. 4). De plus, la fixation des différentes fractions de l'anticorps monoclonal EMAB5, modifié ou non par le DEPC, est très supérieure à celle de l'anticorps monoclonal AD1, utilisé dans ce test comme témoin négatif. Ainsi, la modification des résidus d'histidine par le DEPC n'induit pas de changement dans la capacité de l'anticorps monoclonal EMAB5 à se fixer aux hématies Rh(D+) ni au récepteur CD16 présent à la surface de la lignée cellulaire Jurkat CD16.

Par contre, l'activité fonctionnelle de l'anticorps monoclonal EMAB5 modifié par le DEPC est très diminuée. Ainsi, la sécrétion d'IL-2 de la lignée Jurkat CD16 induite par les fractions FR et FNR de l'anticorps monoclonal EMAB5 modifié par le DEPC représente, respectivement, 42,8% et 19,5% de la sécrétion induite par l'anticorps témoin (Fig. 5). Les résultats de l'activité ADCC, exprimés en % de lyse réelle, montrent que l'activité de la fraction FNR est inférieure à celle de la fraction FR (Fig.6). D'autre part, la fraction FR présente une diminution de l'activité ADCC par rapport à l'anticorps témoin, lorsque la quantité d'anticorps ajoutée dans le puits est plus faible (< 20 ng/ml) et que la quantité d'IgG polyvalentes est de 2,5 mg/ml.

En conclusion, bien qu'ayant conservé leur capacité à fixer l'antigène et le récepteur FcγRIII (CD16), les fractions d'anticorps monoclonal EMAB5 modifiées par le DEPC présentent une activité fonctionnelle (ADCC, induction de la sécrétion de cytokine) diminuée. Cette diminution d'activité est plus marquée pour la fraction FNR, fraction
5 qui présente vraisemblablement une modification du résidu His435.

Ces résultats montrent donc que la conservation du résidu His435 est importante pour la préservation de l'activité fonctionnelle des anticorps de type IgG1.

10 **EXEMPLE 4 : Activité fonctionnelle des anticorps portant la double mutation His310-435Lys**

La modification des résidus d'histidine par un agent chimique (DEPC ou autre) ne permet de maîtriser ni le degré, ni la localisation des modifications. Ainsi, les deux
15 résidus d'histidine, His310 et His435, qui jouent un rôle essentiel dans la liaison du cation zinc à l'interface CH2-CH3 des IgG1, sont substituées par des résidus de lysine, par mutagenèse dirigée.

20 1. Obtention d'un anticorps anti-Rh(D) portant la double mutation His310-435Lys

Le vecteur d'expression contenant le cDNA codant la séquence d'acides aminés de la chaîne lourde de l'anticorps anti-Rh(D) EMAB5, a servi de matrice pour la réalisation d'une double mutagenèse dirigée réalisée par PCR (« PCR-based site-directed mutagenesis »). Les quatre substitutions nucléotidiques suivantes ont été introduites:

- 25 - C1229A et C1301G pour le changement du résidu His338 en Lys (position 310 selon la numérotation de Kabat), soit CAC→AAG;

C1674A et C1676G pour la mutation du résidu His463 en Lys (position 435 selon la numérotation de Kabat), soit CAC → AAG.

La séquence mutée a été séquencée et les résultats du séquençage sont donnés à le

5 Tableau III.

Tableau III : Séquences oligonucléotidique et polypeptidique de la chaîne lourde doublement mutée de l'anticorps monoclonal EMAB5

Les résidus His338 et His461 de la chaîne lourde de l'anticorps monoclonal EMAB5, qui correspondent aux résidus His310 et His435 selon la numérotation de Kabat, ont été substitués par des résidus de lysine.

Séquence du cDNA du double mutant His310-435Lys (SEQ ID No 1)

atggagtttgggctgagctgggtttcctcgttgctctttaagaggtgtccagtgctcaggtgcagctggtggagtctgggggag
15 gcgtgggtccagcctgggaggtccctgagactctcctgtacagcctctggattcacctcaaaaactatgctatgcattgggtcc
gccaggctccagccaaggggctggagtgggtggcaactatatcatatgatggaaggaatatacaatatgcagactccgtgaa
gggcccgatgcaccttctccagagacaattctcaggacaccctgtatctgcaactgaacagcctcagaccggaggacacggct
gtgtattactgtgcgagaccgtaagaagccgatgggtgcaattaggtcttgaagatgctttcatatctggggccaggggaca
atggtcaccgtctcttcagcctccaccaagggcccatcggctctccccctggcaccctcctcaagagcacctctgggggcac
20 agcggccctgggctgcttggtcaaggactactccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcgg
cgtgcacacctcccgggtgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttg
gcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttagcccaaattctgtg
acaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtcttctcttcccccaaaacccaa
ggacaccctcatgatctccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttc
25 aactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgt
ggtcagcgtcctcaccgtcctgaagcaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctccc
agccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccggg
atgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggctaaaggcttctatccagcgacatgccgtggagtgggaga
gcaatgggcagccggagacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctctctacagcaagct

caccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaacaagtacac
gcagaagagcctctccctgtctccgggtaaatag

Séquence peptidique du double mutant His310-H435Lys (SEQ ID No 2) :

5
1 MEFGLSWVFL VALLRGVQCQ VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CTASGFTFKN
51 YAMHWVRQAP AKGLEWVATI SYDGRNIQYA DSVKGRCTFS RDNSQDTLYL
101 QLNSLRPEDT AVYYCARPVR SRWLQLGLED AFHIWGQGTMT VTVSSASTKG
151 PSVFPLAPSS KSTSGGTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA
10 201 VLQSSGLYSL SSVVTVPSST LGTQTYICNV NHKPSNTKVD KKVEPKSCDK
251 THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
301 VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLQKD WLNGKEYKCK
351 VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLT PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF
401 YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
15 451 FSCSVMEAL HNKYTQKSLS LSPGK*

Les cellules YB2/0, co-transfectées par électroporation avec le vecteur muté EMAB5-H-K338-K463-1 et le vecteur EMAB5- dhfr-K- SpeI codant pour la chaîne légère de l'anticorps EMAB5, sont cultivées en milieu RPMI additionné de 5% de SVF dialysé, 0,5% de G418 et 25 nM de Méthotrexate (MTX). Les clones sécrétant les plus forts taux d'IgG humaines sont cultivés en plaques de 24 puits en milieu sans MTX. Les surnageants, récoltés après 7 jours de culture, sont utilisés pour faire les essais décrits ci-dessous.

25 2. Mesure de la fixation du Fc des anticorps au récepteur FcγRIII (CFC)

Ce test est réalisé sur les surnageants de culture, le taux d'IgG humaines contenu dans les surnageants étant déterminé par dosage ELISA.

Les puits d'une plaque de microtitration sont recouverts par des hématies Rh(D+) papainées. Les surnageants de culture contenant les anticorps anti-Rh(D) natifs ou mutés et dilués à des concentrations variant de 7,8 à 500 ng/ml en IMDM + 2,5% SVF.

sont déposés en parallèle sur deux plaques de microtitration préalablement « coatées » par les hématies. Après 90 min. d'incubation à 37°C, les puits sont lavés.

L'une des plaques, utilisée pour détecter les IgG fixées sur les hématies, est incubée en présence d'un anticorps de souris anti-Fc γ humain marqué à la phosphatase alcaline (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

Dans l'autre plaque, les cellules Jurkat CD16 sont ajoutées après 15 min. de contact à 37°C, la plaque est centrifugée en augmentant progressivement la vitesse et la durée de centrifugation jusqu'à négativer les témoins négatifs. Après centrifugation, la lecture des puits est effectuée et un score est donné en fonction de l'étalement de cellules Jurkat CD16 dans le puits.

3. Mesure de l'activation du récepteur CD16

Dans une plaque de microtitration de 96 puits, on dépose successivement 50 μ l de dilutions de surnageants de culture contenant des anticorps anti-Rh(D) natifs ou mutés, 50 μ l d'une suspension d'hématies à 6.10^5 /ml, 50 μ l d'une suspension de cellules Jurkat CD16 à 1.10^6 /ml et 50 μ l d'une solution de PMA à 40 ng/ml. Toutes les dilutions ont été réalisées en milieu de culture IMDM contenant 5% de SVF.

Après 16 heures d'incubation à 37°C et 7% de CO₂, la plaque de microtitration est centrifugée et la quantité d'IL-2 contenue dans le surnageant est dosée par un kit commercial (Duoset, R&D). Les taux d'IL-2 sécrétés sont exprimés en pg/ml.

Les résultats sont exprimés en % d'activation CD16, le taux d'IL-2 sécrétée en présence de l'anticorps monoclonal témoin étant considéré égal à 100%

Les différents tests ont été réalisés sur les surnageants de culture contenant les anticorps monoclonaux anti-Rh(D) mutés ou non. Les résultats du test CFC montrent que la double mutation His310-435Lys n'induit pas de modification de la fixation de l'anticorps au récepteur Fc γ RIII, porté par la lignée cellulaire Jurkat CD16 (Fig.7). Alors que le clone non muté 6H11 (témoin négatif) présente une fixation au récepteur

FcγRIII diminuée, les clones mutés 1C7, 2H11, 4G5 et 4H10 fixent le récepteur FcγRIII de manière similaire aux clones non mutés 16D11 et 11G5 (témoins positifs).

5 L'activation CD16 a été réalisée sur les surnageants de culture de 4 clones mutés cités ci-dessus et de 3 clones non mutés (16D11, 11G5 et 24G9). Les résultats représentent la moyenne (+/- écart-type) des taux d'IL-2 sécrétée par les cellules Jurkat CD16 en présence des clones non mutés (Natif) et des clones mutés (His310-435Lys). Les anticorps mutés induisent une sécrétion d'IL-2 très diminuée par rapport à celle induite par les anticorps natifs (Fig.8). Ainsi, les anticorps mutés présentent une baisse de
10 capacité à activer le récepteur FcγRIII de 50%.

EXEMPLE 5 : Etude de la fixation des anticorps monoclonaux mutés ou non sur le récepteur FcγRIII par cytométrie en flux.

15 L'influence de l'imidazole ainsi que l'impact des mutations His310-435Lys sur la fixation des anticorps au récepteur FcγRIII (CD16) présent à la surface des cellules Jurkat CD16 ont été évalués par cytométrie en flux.

1. Effet de l'imidazole

20 $5 \cdot 10^5$ cellules Jurkat CD16 sont incubées pendant 30 minutes en présence de différentes concentrations de l'anticorps monoclonal EMAB5 dilué en tampon PBS contenant 0,5% d'albumine bovine (SAB) ou en tampon PBS-SAB 0,5% supplémenté à 50 mM en imidazole. Puis les cellules sont lavées en tampon PBS-SAB 0,5% et incubées en présence de F(ab')₂ de souris anti-IgG humaine (H+L) marquée au FITC
25 (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Après 30 minutes d'incubation, les cellules sont lavées comme précédemment et la fixation de l'anticorps EMAB5 est analysée par cytométrie en flux en utilisant un FACScalibur 4CA et le programme Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

2. Fixation de l'anticorps doublement muté

5.10⁵ cellules Jurkat CD16 sont incubées pendant 30 minutes dans du tampon PBS-SAB 0,5% en présence de différentes concentrations d'anticorps monoclonaux contenus dans des surnageants de culture. Puis les cellules sont lavées en tampon PBS-SAB 0,5% et incubées en présence de F(ab')₂ de souris anti-IgG humaine (H+L) marquée au FITC. Après 30 minutes d'incubation, les cellules sont lavées comme précédemment et la fixation des anticorps est analysée par cytométrie en flux en utilisant un FACScalibur 4CA et le programme Cell Quest Pro (Becton Dickinson).

10

Les résultats de la fixation de l'anticorps EMAB5 sur le récepteur CD16 (FcγRIII) présent à la surface des cellules Jurkat CD16 en présence ou non d'imidazole sont présentés en Fig.9.

15

Ainsi, l'addition de 50 mM d'imidazole dans le tampon d'incubation de l'anticorps avec les cellules provoque une diminution de fixation de l'anticorps qui se traduit par une baisse significative du pourcentage de cellules marquées ; à la concentration en anticorps de 1,5 µg/ml, la présence d'imidazole induit une diminution de 40% du nombre de cellules marquées.

20

L'imidazole est un réactif qui a la propriété de fixer les cations. Ainsi, en déprivant le milieu d'incubation des cations s par addition d'imidazole, la fixation de l'anticorps sur le récepteur CD16 est diminué.

La fixation sur le récepteur FcγRIII des cellules Jurkat CD16 de 3 anticorps monoclonaux contenus dans des surnageants de culture est présentée à la Fig.10.

25

Ainsi, les résultats exprimés en pourcentage de cellules marquées en fonction de la quantité d'anticorps ajoutée, montrent que les anticorps 4G5 et 4H10, qui ont la double mutation His310-435Lys, se fixent significativement moins bien aux cellules Jurkat CD16 que le clone 24G9, qui est l'anticorps témoin non muté.

Ces expériences illustrent bien que la fixation des anticorps au récepteur CD16 est affectée par l'absence de cations. Inversement, la présence de cations devrait améliorer la fixation de l'anticorps sur le récepteur et de ce fait améliorer l'activité cytotoxique de l'anticorps.

5

10

REFERENCES

- Chapman TL, You I, Joseph IM, Bjorkman PJ, Morrison SL, Raghavan M.
5 Characterization of the interaction between the herpes simplex virus type I Fc receptor and immunoglobulin G. (1999) J. Biol. Chem. ; **274** : 6911-9.
- Corper AL, Sohi MK, Bonagura VR, Steinitz M, Jefferis R, Feinstein A, Beale D, Taussig MJ, Sutton BJ. Structure of human IgM rheumatoid factor Fab bound to its
10 autoantigen IgG Fc reveals a novel topology of antibody-antigen interaction. (1997) Nat Struct Biol.; **4** : 374-81.
- Deisenhofer J. Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and
15 2.8-A resolution. (1981) Biochemistry. **20**, 2361-70.
- Firan M, Bawdon R, Radu C, Ober RJ, Eaken D, Antohe F, Ghetie V, Ward ES. The MHC class I-related receptor, FcRn, plays an essential role in the maternofetal transfer
20 of gamma-globulin in humans. (2001) Int. Immunol. **13**, 993-1002.
- Maillard P, Lavergne JP, Siberil S, Faure G, Roohvand F, Petres S, Teillaud JL, Budkowska A. Fc gamma receptor-like activity of hepatitis C virus core protein. (2004) J. Biol. Chem. **279**, 2430-7.
25
- Miles EW. Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate. (1977) Methods Enzymol. **47**, 431-42.

Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. (1997) *Methods Enzymol.* **276**, 307-26.

5 Sauer-Eriksson AE, Kleywegt GJ, Uhlen M, Jones TA. Crystal structure of the C2 fragment of streptococcal protein G in complex with the Fc domain of human IgG. (1995) *Structure.* **3**, 265-78.

10 Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, Fox JA, Presta LG. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. (2001) *J Biol Chem.* **276**, 6591-604).

REVENDICATIONS

1. Utilisation de cations métalliques divalents ou trivalents pour améliorer l'activité
5 fonctionnelle d'anticorps.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que lesdits anticorps sont des IgG humaines ou ayant une région Fc humaine.
- 10 3. Utilisation selon l'une de revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que lesdits cations interagissent avec la région Fc desdits anticorps.
4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que lesdits cations participent au contrôle de l'ouverture de la région Fc desdits anticorps.
- 15 5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que lesdits cations favorisent la fixation desdits anticorps aux récepteurs Fc γ R, notamment au récepteur Fc γ RIII.
- 20 6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que ledit cation est le zinc, le fer, le cuivre ou le cadmium.
7. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ledit cation est le zinc.
- 25 8. Méthode pour potentialiser l'activité fonctionnelle des anticorps via la région Fc, comprenant une étape consistant à ajouter une quantité appropriée d'au moins un

cation métallique divalent ou trivalent dans le système biologique produisant les anticorps ou dans une solution comprenant des anticorps avant et/ou après purification ou encore dans la solution de conservation ou dans la formulation finale sous la forme d'une solution injectable des anticorps.

5

9. Méthode selon la revendication 8, caractérisée en ce que ledit cation est le zinc, le fer, le cuivre ou le cadmium.

10

10. Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'on ajoute une concentration molaire en zinc au moins égale à la concentration molaire en anticorps.

11. Anticorps de classe IgG3 possédant un site de fixation pour un cation métallique divalent ou trivalent comprenant les résidus His 310 et His 435 (numérotation de Kabat) sur sa région Fc créé par ingénierie moléculaire.

15

12. Anticorps selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit site de fixation comprend le résidu Asn 434 et/ou le résidu His 433 (numérotation de Kabat).

20

13. Anticorps selon l'une quelconque des revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que ledit site de fixation est créé par substitution de l'Arg 435 par l'His 435.

14. Anticorps selon l'une quelconque des revendications 11 à 12, caractérisé en ce que l'un au moins desdits résidus histidine est remplacé par un au moins des résidus choisis parmi la cystéine, l'acide aspartique et l'acide glutamique.

25

15. Anticorps selon l'une quelconque des revendications 11 à 14, caractérisé en ce qu'il possède un cation métallique divalent ou trivalent fixé sur ledit site de fixation.

16. Anticorps selon l'une quelconque des revendications 11 à 15, caractérisé en ce que ledit cation est le zinc, le fer, le cuivre ou le cadmium.

17. Anticorps selon l'une quelconque des revendications 11 à 16, caractérisé en ce que
5 l'allotype dudit anticorps est G3m(b) ou G3m(g).

18. Anticorps selon l'une quelconque des revendications 11 à 17, caractérisé en ce qu'il possède une fixation au FcγRIII améliorée et une activité fonctionnelle améliorée par rapport à l'anticorps natif.

10

19. Utilisation de l'anticorps selon l'une quelconque des revendications 11 à 18 pour la préparation d'un médicament pour le traitement des pathologies comme la maladie hémolytique du nouveau-né, une pathologie virale, bactérienne ou parasitaire, une pathologie liée aux agents pathogènes ou toxines dérivées, listés comme étant
15 particulièrement dangereux dans les cas de bioterrorisme (classification des Centers for Disease Control, CDC), notamment l'anthrax (*Bacillus anthracis*), le botulisme (*Clostridium botulium*), la peste (*Yersinia pestis*), la variole (*Variola major*), la tularémie (*Francisella tularensis*), les fièvres hémorragiques virales (liées aux filovirus –Ebola, Marburg et aux arenavirus –Lassa, Machupo), la toxine *epsilon* de *Clostridium*
20 *perfringens*, la brucellose (*Brucella species*), la melioidose (*Burkholderia mallei*), la toxine de ricin (*Ricinus communis*).

20. Composition pharmaceutique d'anticorps thérapeutiques comprenant des cations divalents ou trivalents et au moins un excipient.

25

21. Composition selon la revendication 20, caractérisée en ce que lesdits anticorps possèdent un cation métallique divalent ou trivalent sur les résidus His 310 et His 435 (numérotation de Kabat).

22. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 20 à 21, caractérisée en ce que lesdits anticorps sont les anticorps des revendications 11 à 18 ou des IgG humaines ou ayant une région Fc humaine.
- 5 23. Composition pharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 20 à 22, caractérisée en ce que les cations métalliques sont le zinc, le fer, le cuivre ou le cadmium, ou un mélange de plusieurs d'entre eux.
- 10 24. Composition pharmaceutique selon la revendication 23, caractérisée en ce que ledit cation est le zinc, notamment de l'acétate de zinc, du bromure de zinc, du citrate de zinc, de l'hydroxycarbonate de zinc, de l'iodure de zinc, du L-lactate de zinc, du nitrate de zinc, du stéarate de zinc, du gluconate de zinc, du sulphate de zinc, du chlorure de zinc ou du chlorhydrate de zinc.
- 15 25. Composition pharmaceutique dans laquelle au moins 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou encore 99% des anticorps possèdent un cation métallique divalent ou trivalent lié, notamment lié au site comprenant les résidus His 310 et His 435 (numérotation de Kabat).
- 20 26. Composition selon la revendication 25, caractérisée en ce que ledit site comprend les résidus His 433 et/ou Asn 434 (numérotation de Kabat).
- 25 27. Composition selon l'une quelconque des revendications 25 ou 26, caractérisée en ce que ledit cation métallique est le zinc, le fer, le cuivre ou le cadmium, ou un mélange de plusieurs d'entre eux.
28. Solution comprenant un anticorps monoclonal ou des anticorps polyclonaux et une quantité appropriée en cation métallique divalent ou trivalent, en particulier une concentration en ions zinc au moins égale à la concentration en anticorps, ladite

solution étant adaptée pour une injection par voie intraveineuse, intramusculaire, ou sous-cutanée.

29. Utilisation d'ions zinc pour améliorer la cristallisation d'anticorps thérapeutiques.

5

30. Test permettant d'évaluer l'efficacité d'un anticorps comprenant l'étude de la conformation 3D du domaine impliquant His 310, His 435, His 433 et/ou Asn 434 (numérotation de Kabat) telle que montrée à la figure 1 ou 2 ou encore un dosage de la teneur en Zinc desdits anticorps, la présence de zinc étant une indication de l'efficacité de l'anticorps.

10

31. Anticorps possédant l'un au moins de ses résidus His 310 et His 435 modifié (numérotation de Kabat).

15

32. Anticorps selon la revendication 31, caractérisée en ce que ladite modification est une mutation.

20

33. Anticorps selon la revendication 32, caractérisé en ce que ladite mutation est une substitution par un acide aminé possédant une faible affinité pour lesdits cations métalliques.

25

34. Anticorps selon la revendication 33, caractérisé en ce que ledit acide aminé est la lysine, l'alanine, la glycine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la méthionine, le tryptophane, la phénylalanine, la sérine ou la thréonine.

35. Anticorps selon l'une quelconque des revendications 32 à 34, caractérisé en ce que les résidus His 310 et His 435 sont substitués par des résidus lysine.

36. Anticorps selon la revendication 31, caractérisé en ce que la modification est effectuée par le DEPC.

37. Anticorps selon l'une quelconque des revendications 31 à 36, caractérisé en ce qu'ils appartiennent à la sous-classe des IgG1.

38. Anticorps selon l'une quelconque des revendications 31 à 37, caractérisé en ce qu'ils possèdent une activité fonctionnelle diminuée par rapport au même anticorps non modifié.

39. Utilisation des anticorps 31 à 38 pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention du rejet de greffe ou au traitement d'une pathologie choisie parmi le tétanos, la diphtérie, ou provoquée par un agent pathogène ou toxine dérivée, listé comme étant particulièrement dangereux dans les cas de bioterrorisme (classification des Centers for Disease Control, CDC), notamment l'anthrax (*Bacillus anthracis*), le botulisme (*Clostridium botulium*), la peste (*Yersinia pestis*), la variole (*Variola major*), la tularémie (*Francisella tularensis*), les fièvres hémorragiques virales (liées aux filovirus -Ebola, Marburg et aux arenavirus -Lassa, Machupo), la toxine *epsilon* de *Clostridium perfringens*, la brucellose (*Brucella species*); la melioidose (*Burkholderia mallei*), la toxine de ricin (*Ricinus communis*).

40. Utilisation de l'anticorps selon l'une quelconque des revendications 31 à 38 pour la préparation d'un médicament en remplacement des IgG4.

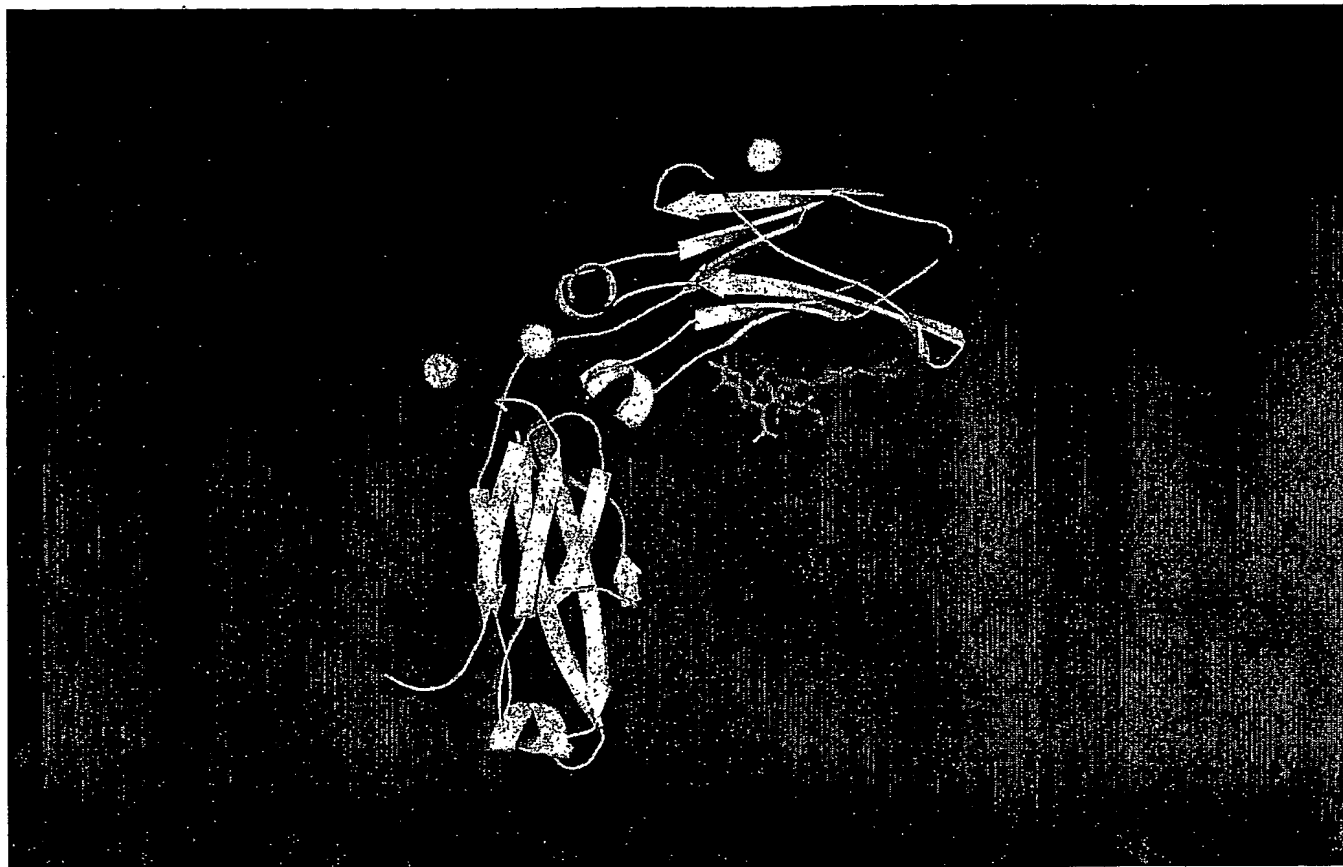


Figure 1

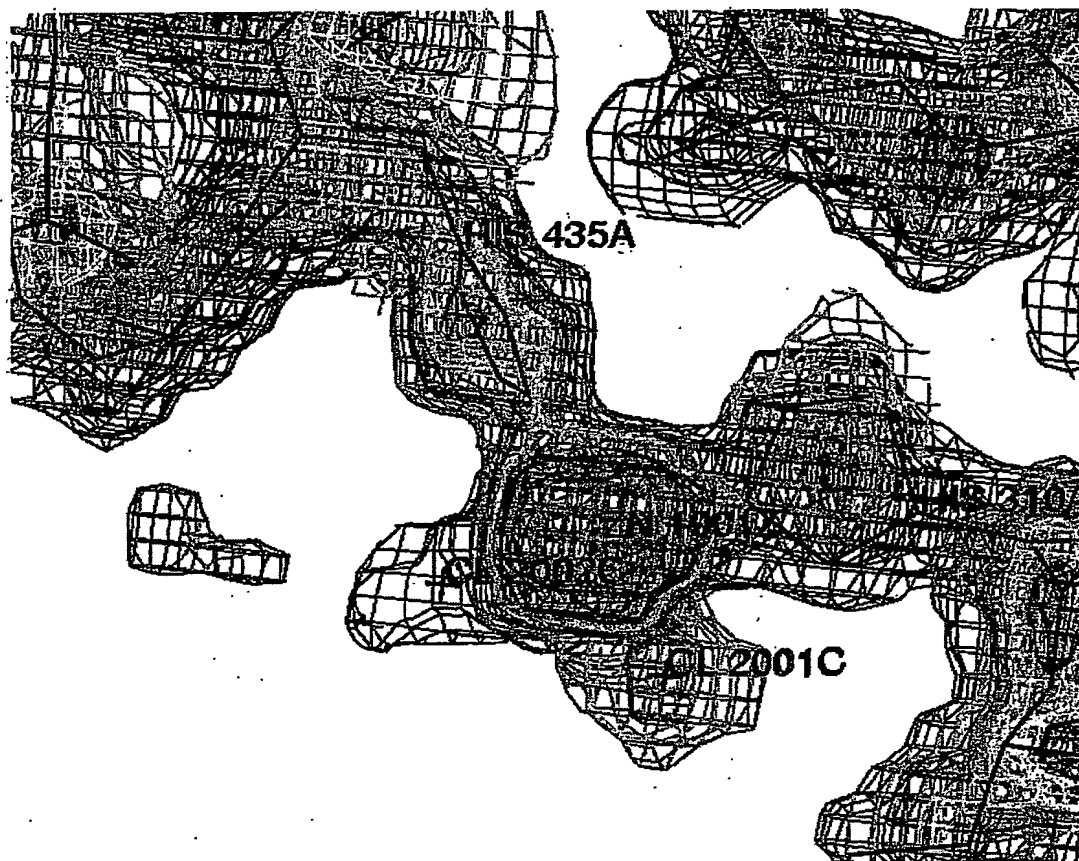


Figure 2

3 / 9

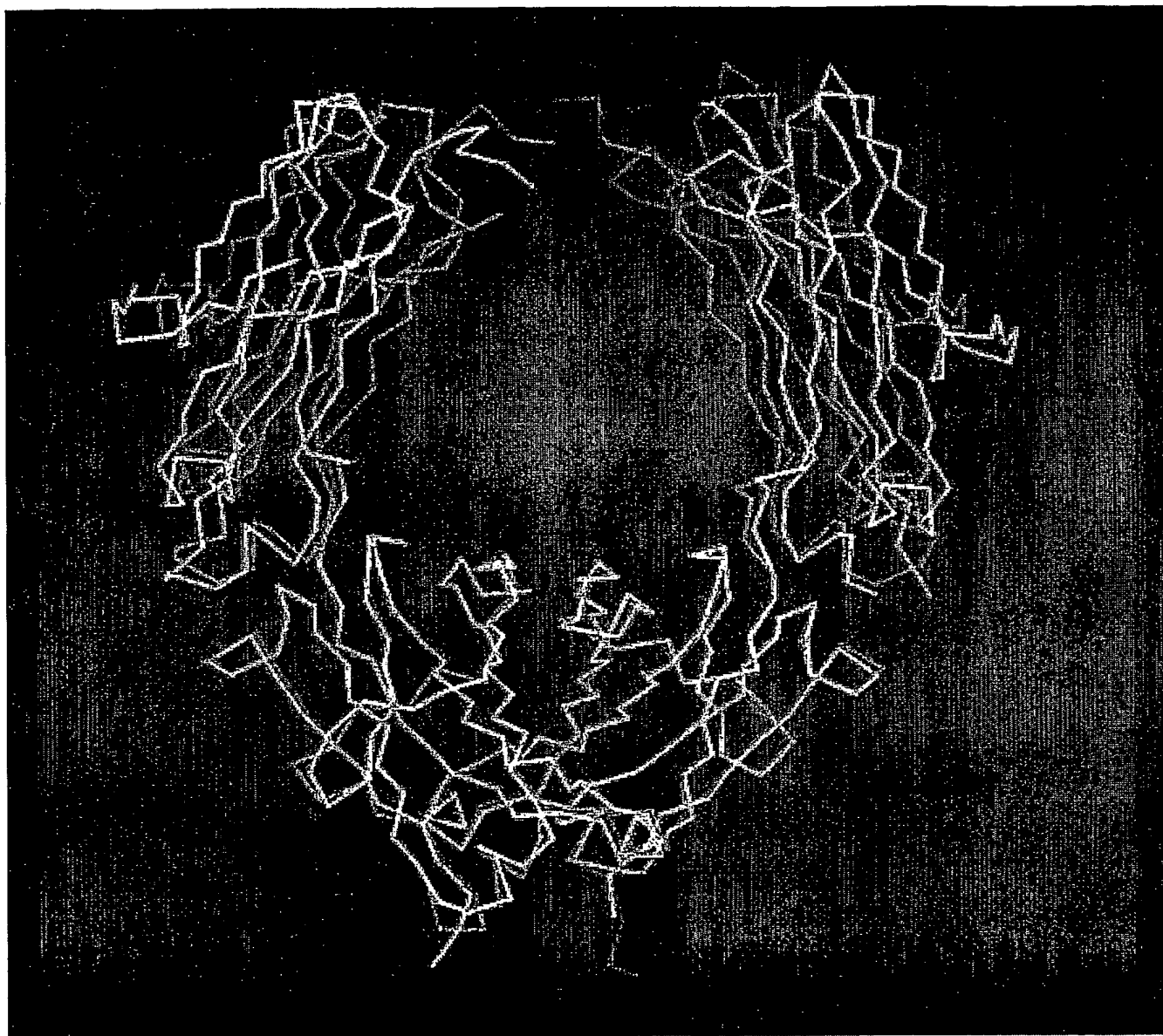


Figure 3

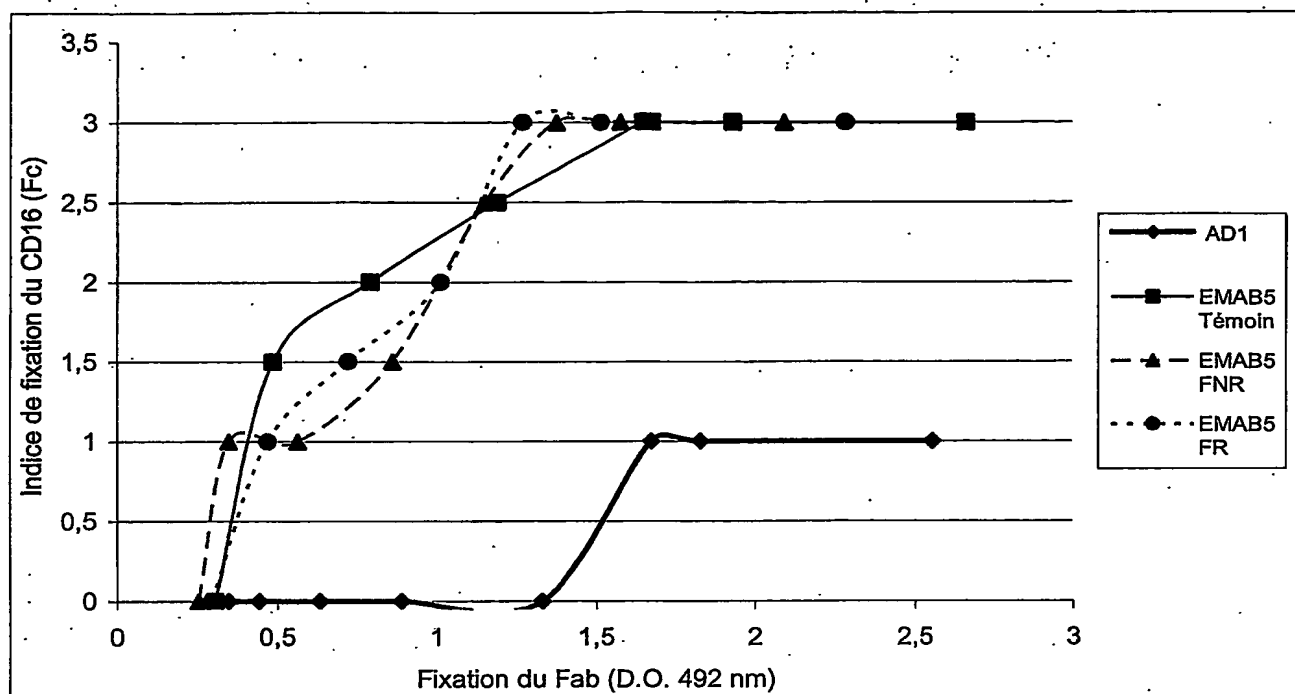


Figure 4

5/9

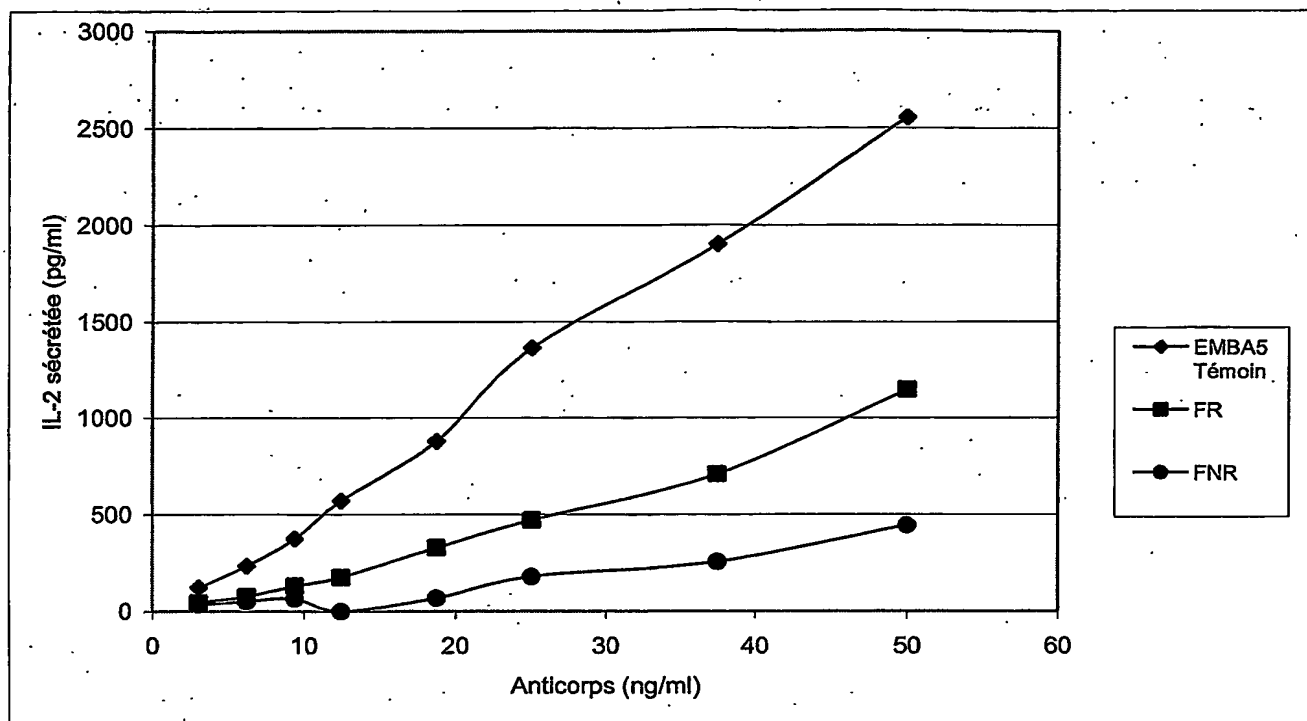


Figure 5

6 / 9

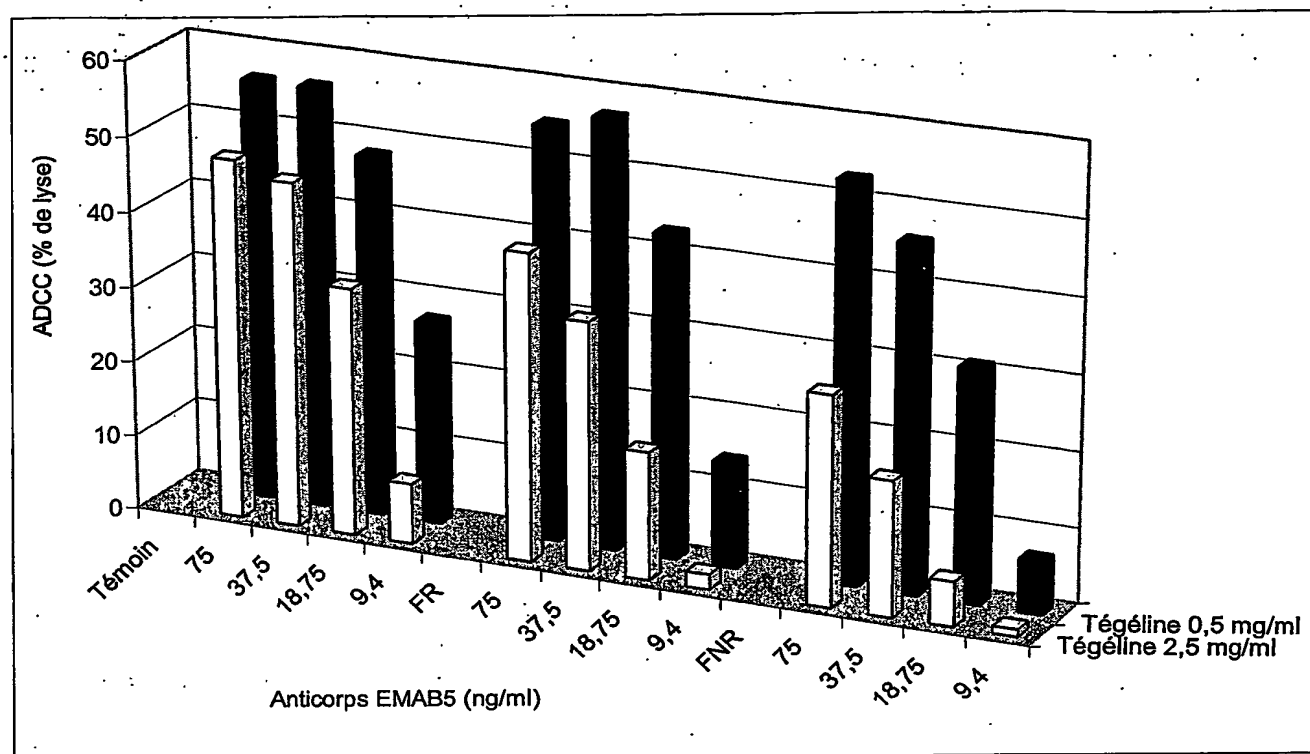


Figure 6

7/9

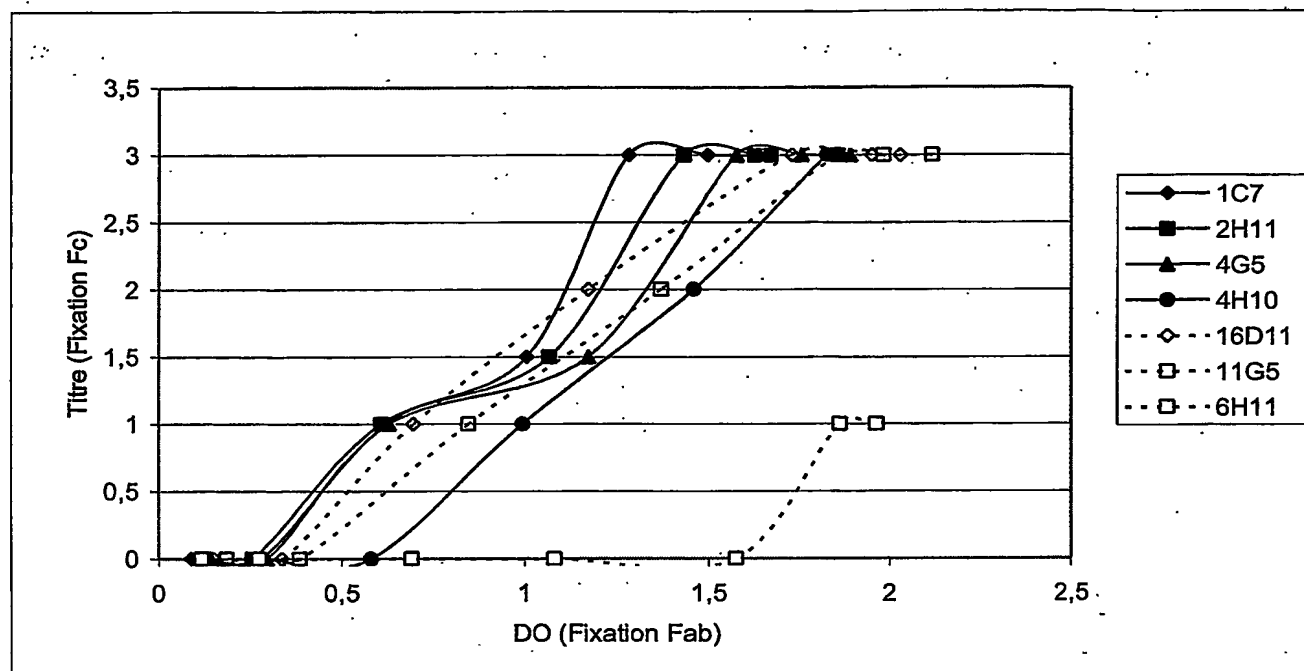


Figure 7

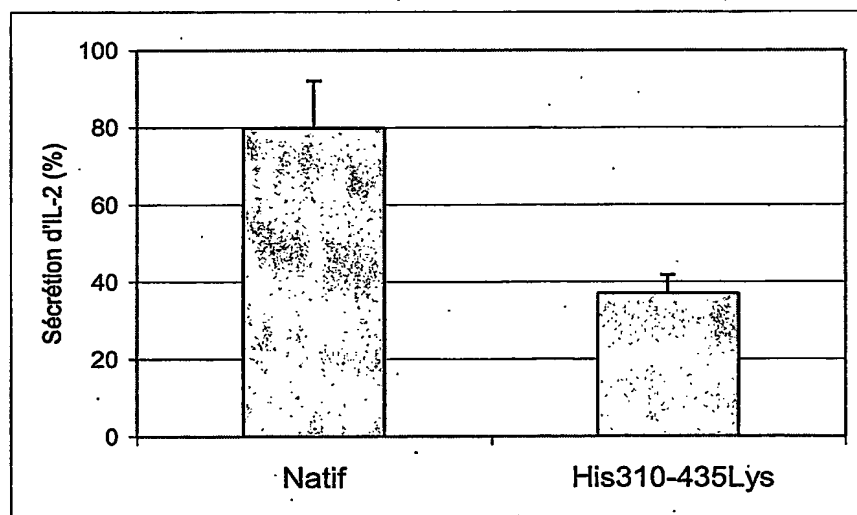


Figure 8

8 / 9

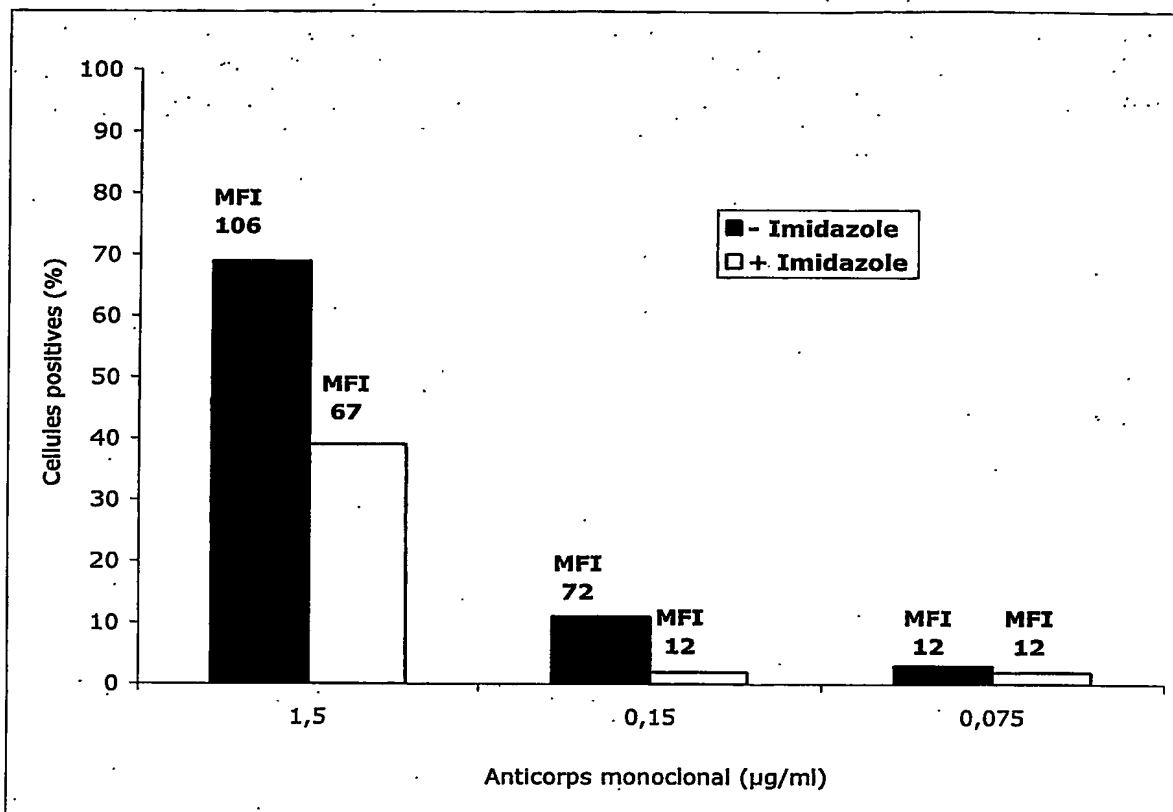


Figure 9

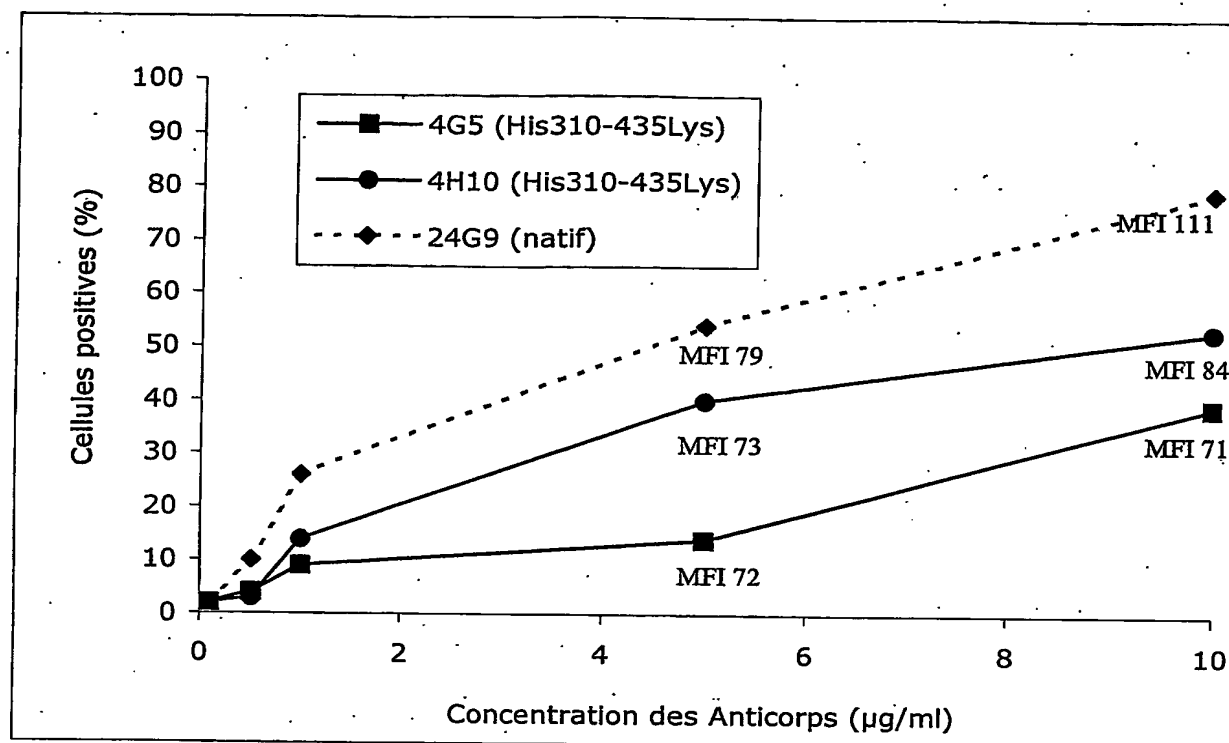


Figure 10

LISTE DE SEQUENCES

<110> LABORATOIRE FRANÇAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES

<120> UTILISATION DE CATIONS METALLIQUES DIVALENTS POUR L'AMELIORATION DE L'ACTIVITE FONCTIONNELLE DES ANTICORPS

<130> D 21 711 NT

<150> FR 03 12228

<151> 2003-10-20

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1428

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Séquence du cDNA du double mutant His310-435Lys

<400> 1

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggccct gagactctcc	120
tgtacagcct ctggattcac cttcaaaaac tatgctatgc attgggtccg ccaggctcca	180
gccaaagggc tggagtgggt ggcaactata tcatatgatg gaaggaatat acaatatgca	240
gactccgtga agggccgatg caccttctcc agagacaatt ctcaggacac cctgtatctg	300
caactgaaca gcctcagacc ggaggacacg gctgtgtatt actgtgagag acccgtaaga	360
agccgatggc tgcaattagg tcttgaagat gcttttcata tctggggcca ggggacaatg	420
gtcaccgtct cttcagcctc caccaagggc ccatcggtct tccccctggc accctcctcc	480
aagagcacct ctggggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa	540
ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggt	600
gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc	660
ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac	720
aagaaagttg agcccaaata ttgtgacaaa actcacacat gccaccgtg cccagcacct	780
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc ttccccccaa aaccaagga caccctcatg	840
atctcccggg cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag	900
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg	960
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gaagcaggac	1020

tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc 1080
 gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc 1140
 ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggg caaaggettc 1200
 tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1260
 accaagcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg 1320
 gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg 1380
 cacaacaagt acacgcagaa gagecctctcc ctgtctccgg gtaaatag 1428

<210> 2
 <211> 475
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Séquence peptidique du double mutant His310-H435Lys.

<400> 2

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Lys Asn Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Ala Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Asn Ile Gln Tyr Ala
 65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Cys Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asp
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Val Arg Ser Arg Trp Leu Gln Leu Gly Leu
 115 120 125

Glu Asp Ala Phe His Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 130 135 140

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
145 150 155 160

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
165 170 175

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
180 185 190

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
195 200 205

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
210 215 220

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
225 230 235 240

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
245 250 255

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
260 265 270

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
275 280 285

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
290 295 300

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
305 310 315 320

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
325 330 335

Leu Lys Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
340 345 350

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
355 360 365

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
370 375 380

WO 2005/040216

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
385 390 395 400

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
405 410 415

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
420 425 430

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
435 440 445

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Lys Tyr
450 455 460

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.